

آنالیز بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی میکرو RNA های بالقوه

مهارکننده فرایندهای رگزایی در سرطان

فاطمه طرقي*^۱، یعقوب طرقي^۲

۱- کارشناس ارشد بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، واحد امور دارویی بستان آباد، بستان آباد، ایران.

۲- کارشناس ارشد انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، آزمایشگاه هشتگرد، هشتگرد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: با افزایش اندازه تومور، محیط سلول‌های توموری هیپوکسیک و اسیدیک شده و سلول‌ها شروع به افزایش تولید چندین نوع عامل رشد می‌کنند که در نتیجه آن تشکیل رگ‌های خونی موضعی آغاز می‌شود. به دنبال آن متاستاز سلول‌های سرطانی از طریق عروق خونی اتفاق می‌افتد، لذا مهار رگزایی می‌تواند روش جدیدی برای درمان سرطان باشد. این مطالعه به منظور آنالیز بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی میکرو RNA های بالقوه مهارکننده فرایندهای رگزایی در سرطان انجام گردید.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی میکرو RNA های با قابلیت اتصال به ژن‌های MMP دخیل در رگزایی تومور (MMP1-2-3-8-9-10-11-13) با استفاده از پایگاه داده mirwalk شناسایی گردید. انتخاب micro RNA های موثر براساس تعداد جایگاه اتصال آنها به 3'UTR ژن‌ها انجام شد. برای تعیین توالی کامل ژن نمونه با micro RNA های منتخب از پایگاه داده Microna استفاده گردید.

یافته‌ها: بیشترین تعداد جایگاه اتصال به ژن‌های دخیل در رگزایی تومور mir-516a ، mir-1302 ، mir-511 ، mir-512 ، mir-516b و mir-548 تعیین شد.

نتیجه‌گیری: micro RNA ها گزینه‌های مناسبی برای کشت سلولی و بررسی آزمایشگاهی به منظور یافتن راه‌های جدید پیشگیری از پیشرفت سرطان از طریق مهار رگزایی هستند.

کلید واژه‌ها: بیوانفورماتیک ، رگزایی ، ماتریکس متالوپروتیناز ، micro RNA

* نویسنده مسؤول : فاطمه طرقي ، پست الکترونیکی fatoroghi@gmail.com

نشانی: تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، بستان آباد، امور دارویی، تلفن ۰۴۱-۴۳۳۴۶۷۱-۰۴۱ ، شماره ۴۳۳۴۶۷۶

وصول مقاله: ۱۳۹۶/۱/۱ ، اصلاح نهایی: ۱۳۹۶/۱۲/۲۵ ، پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱/۲۸

مقدمه

تومور در اثر رشد کنترل نشده سلول‌های بیمار در قسمتی از بدن شکل می‌گیرد. در صورتی که توده سلولی ایجاد شده به حجم ۲ میلی‌متر مکعب برسد؛ برای تامین اکسیژن و دریافت مواد مغذی نیاز به ایجاد رگ‌هایی در درون توده دارد (۱۰). با افزایش اندازه تومور محیط سلول‌های توموری هیپوکسیک و اسیدیک شده و شروع به افزایش تولید چندین نوع عامل رشد می‌کنند که در نتیجه آن تشکیل رگ‌های خونی موضعی آغاز می‌شود. به دنبال آن متاستاز سلول‌های سرطانی از طریق عروق خونی اتفاق می‌افتد (۱۱-۱۳). بنابراین مهار رگزایی به دلیل مهار رشد تومور، می‌تواند روش جدیدی برای درمان سرطان باشد.

میکروریبونوکلئیک اسیدها (میکرو RNA ها)، ریبونوکلئیک اسیدهای غیر کدکننده‌ای هستند که از نظر تکاملی محافظت شده بوده و دارای طولی برابر ۲۵-۱۸ نوکلئوتید هستند. میکروRNA ها

پس از شکل‌گیری شبکه رگی در رویان رگزایی شبکه عروقی با جوانه‌زنی رگ‌های جدید از رگ‌هایی موجود شکل می‌گیرد (۲۱). در بالغین رگزایی طبیعی طی سیکل تخمک‌گذاری و فرایندهای ترمیمی فیزیولوژیکی انجام می‌گیرد (۳-۵). تشکیل رگ‌های فعال مستلزم برهم‌کنش‌های هماهنگ بین سلول‌های اندوتلیال، ماتریکس خارج سلولی و سلول‌های احاطه‌کننده آنها است. مهم‌ترین محرک‌های رگزایی ایسکمی بافتی، هیپوکسی، التهاب، ماتریکس متالوپروتینازها (MMPs)، عامل رشد رگی و سیتوکاین‌های التهابی هستند (۶-۸). البته رگزایی طبیعی با واسطه تعادل بین عوامل القاکننده و مهارکننده رگزایی تنظیم می‌گردد و در صورتی که این تعادل از بین برود؛ زمینه برای بروز برخی بیماری‌ها از جمله رشد تومور و متاستاز سلول‌های سرطانی فراهم می‌شود (۹).

جدول ۱: مشخصات برخی ژن‌های MMP های دخیل در رگزایی و عوامل محرک رگزایی که توسط فعالیت MMP ها آزاد و فعال شده‌اند.

ژن	شماره کروموزوم	نام
VEGFA	۶	عامل رشد اندوتلیال عروقی EGFA A
PDGFA	۷	زیر واحد A عامل رشد مشتق شده از پلاکت
MMP9	۲۰	ماتریکس متالوپروتیناز-۹ کدکننده پروتئین کلاژناز IV به وزن ۹۲ کیلو دالتون
MMP8	۱۱	ماتریکس متالوپروتیناز-۸ کدکننده کلاژناز نوتروفیلی
MMP3	۱۱	ماتریکس متالوپروتیناز-۳ که کدکننده پروتئین Stromelysin1
MMP2	۱۶	ماتریکس متالوپروتیناز-۲ کدکننده پروتئین ژلاتیناز
MMP13	۱۱	ماتریکس متالوپروتیناز-۱۳ کدکننده پروتئین کلاژناز III
MMP11	۲۲	ماتریکس متالوپروتیناز-11 کدکننده پروتئین Stromelysin3
MMP10	۱۱	ماتریکس متالوپروتیناز-10 کدکننده پروتئین Stromelysin2
MMP1	۱۱	ماتریکس متالوپروتیناز-1 کدکننده کلاژناز فیبروبلاستی
IL8	۴	اینترلوکین ۸ عامل کموتاکسی
CSF1	۱	عامل تحریک کلونی ۱
CCL2	۱۷	کموکاین‌داری موتیف C-C (پروتئین جذب کننده مونوسیت)

سرطانی به نقاط دیگر بدن پیشگیری نمود. این مطالعه به منظور آنالیز بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی میکرو RNA های بالقوه مهارکننده فرایندهای رگزایی MMPs در سرطان انجام گردید.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی با استفاده از مطالعات پیشین، ژن‌های MMPs دخیل در رگزایی و عوامل محرک رگزایی که در اثر فعالیت پروتئیناز MMPs آزاد می‌شوند (۲۰) شناسایی و فهرستی از آنها تهیه شد. مشخصات برخی از این ژن‌ها در جدول یک آمده است. سپس بررسی‌های بیوانفورماتیکی برای یافتن micro RNA هایی که ژن‌های مذکور را مورد هدف قرار می‌دهند؛ انجام شد. با استفاده از اطلاعات پنج الگوریتم اصلی پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال micro RNA ها، micro RNA هایی که توانایی شناسایی ژن‌های مورد نظر را در ناحیه ۳'UTR داشتند و تعداد بازهای seed آنها حداقل ۷ عدد بود؛ شناسایی گردید (جدول ۲).

فایل اکسل بر اساس نام micro RNA مرتب شد. بررسی micro RNA هایی که در مجموع دارای تعداد جایگاه اتصال بیشتری برای ژن‌های مورد نظر بودند؛ انجام گردید (جدول ۳).

یافته‌ها

در مرحله اول با استفاده از نتایج مطالعات پیشین، ژن‌های MMP دخیل در رگزایی تومور (MMP1-2-3-8-9-10-11-13)، عوامل موثر در رگزایی مانند عامل رشد فیبروبلاستی (FGF) و عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و اینترلوکین ۸ (IL8) و همچنین ژن‌های دخیل در کموتاکسی نظیر عامل تحریک کننده کلنی (CSF1) و عامل رشد مشتق از پلاکت (PDGF) که با فعالیت MMP ها فعال می‌شوند؛ شناسایی شد.

در مرحله بعدی، بررسی بیوانفورماتیکی در پایگاه miRWalk 2.0، منجر به شناسایی تعداد ۷۷۶۳ توالی مکمل شده ژن micro RNA و گردید. در پایگاه توالی براساس مکمل شدن مطابق قانون واتسون و کریک (۲۳ و ۲۴) جستجو می‌شود. در شکل یک

بیان ژن‌ها را به وسیله تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آنها کنترل می‌کنند (۱۵ و ۱۴). به نظر می‌رسد استفاده از میکروRNA ها برای تجزیه عوامل محرک رگزایی می‌تواند در متوقف کردن رشد توده و متاستاز سلول‌های سرطانی موثر باشد. به عنوان مثال در مطالعه‌ای مهار رگزایی القا شده با عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) باعث سرکوب رشد تومور در شرایط in vivo گردید (۱۶). امروزه با استفاده از پایگاه‌های اینترنتی متعددی امکان پیش‌بینی ژن‌های هدف میکروRNA ها فراهم است. از جمله این پایگاه‌ها می‌توان به www.targets.org و www.microRNA.org اشاره نمود. همچنین پایگاه miRWalk که امکان بررسی هم‌زمان ژن‌های هدف را توسط چندین الگوریتم از جمله DIANAmt، miRanda، PICTAR5 و TargetsScan فراهم می‌کند؛ وجود دارد.

ماتریکس متالوپروتینازها با تجزیه ماتریکس خارج سلولی فضای لازم برای مهاجرت سلولها را فراهم می‌کند و با شکستن اتصالات پروتئین‌های مختلف، باعث آزادسازی عوامل رشد سلولی و عوامل رگزایی و فعالیت آنها می‌شود. VEGF و FGF توسط فعالیت MMP ها آزاد می‌شوند که منجر به رشد سلول‌های عروقی می‌گردد. باور بر این است که VEGF برای آغاز رگزایی در تومورها عمل کرده و FGF برای نگهداری رگزایی و پیشرفت آن مورد نیاز است (۱۳). از طرفی میزان بیان برخی از MMP ها در انواع سرطان افزایش می‌یابد و در نتیجه سطح خونی و بافتی آنها در بافت سرطانی بالاتر می‌رود (۲۰-۱۷). IL-8 از گلبول‌های سفید درشت‌خوار، لنفوسیت و بافت اندوتلیال ترشح می‌شود و حداقل قسمتی از رگزایی القا شده توسط آن به توانایی تحریک تولید MMP-2 ارتباط دارد. از سویی عوامل دخیل در کموتاکسی با جذب سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های ایمنی و تولید MMP بیشتر توسط این سلول‌ها به فرایند رگزایی کمک می‌کنند (۲۱ و ۲۲). بنابراین احتمال دارد با مهار ترجمه MMP ها با استفاده از میکرو RNA ها از بزرگ شدن توده سرطانی و احتمال مهاجرت سلول‌های

جدول ۲: بخشی از اطلاعات ارایه شده توسط پایگاه miRWalk 2.0

SUM	Targetscan	PICTAR5	miRWalk	miRanda	DIANAmT	miRNA	Gene
۵	۱	۱	۱	۱	۱	hsa-miR-218	SDC2
۵	۱	۱	۱	۱	۱	hsa-miR-32	SDC2
۵	۱	۱	۱	۱	۱	hsa-miR-9	SDC2
۵	۱	۱	۱	۱	۱	hsa-miR-27b	SDC2
۵	۱	۱	۱	۱	۱	hsa-miR-9	SDC2
۵	۱	۱	۱	۱	۱	hsa-miR-25	SDC2
۵	۱	۱	۱	۱	۱	hsa-miR-9	SDC2
۵	۱	۱	۱	۱	۱	hsa-miR-96	SDC2
۵	۱	۱	۱	۱	۱	hsa-miR-182	SDC2
۵	۱	۱	۱	۱	۱	hsa-miR-218	SDC2
۴	۱	۰	۱	۱	۱	hsa-let-7e	MMP11
۴	۱	۰	۱	۱	۱	hsa-miR-124	MMP2

جدول ۳: مرتب سازی فایل اکسل براساس نام micro RNA

SUM	Targetscan	PICTAR5	miRWalk	miRanda	DIANAmT	StemLoopID	miRNA	Gene
۴	۱	۰	۱	۱	۱	hsa-let-7a-3	hsa-let-7a	MMP1
۴	۱	۰	۱	۱	۱	hsa-let-7a-3	hsa-let-7a	IL8
۴	۱	۰	۱	۱	۱	hsa-let-7a-1	hsa-let-7a	MMP11
۴	۱	۰	۱	۱	۱	hsa-let-7a-2	hsa-let-7a	MMP11
۴	۱	۰	۱	۱	۱	hsa-let-7a-3	hsa-let-7a	MMP11
۴	۱	۰	۱	۱	۱	hsa-let-7a-1	hsa-let-7a	MMP1
۴	۱	۰	۱	۱	۱	hsa-let-7a-1	hsa-let-7a	IL8
۴	۱	۰	۱	۱	۱	hsa-let-7a-2	hsa-let-7a	MMP1
۱	۱	۰	۱	۱	۱	hsa-let-7a-2	hsa-let-7a	IL8
۱	۰	۰	۰	۱	۰	hsa-let-7a-2	hsa-let-7a	MMP8

استفاده نمایند. علاوه بر این، اهمیت استفاده از microRNA ها برای درمان به این دلیل است که یک microRNA می تواند صدها هدف ژنی داشته باشد که اغلب این اهداف مربوط به mRNA ها با عملکرد مشابه است. در درمان سرطان ها از خود microRNA ها به تنهایی یا همراه با داروها، شیمی درمانی ها و رادیوتراپی استفاده شده است (۲۵ و ۲۶). لذا به نظر می رسد می توان با استفاده از microRNA های متصل شونده به ژن های دخیل در رگرایی به ویژه در توده های سرطانی، از پیشرفت رگرایی در سرطان پیشگیری نمود. برای انجام این کار اولین اقدام پیش بینی و شناسایی microRNA های بالقوه متصل شونده به mRNA های دخیل در رگرایی است.

بانک اطلاعات miRWalk شامل دو بخش است. الف) اهداف پیش بینی شده، اطلاعات تعامل و مکمل شدن ژن هدف - miRNA بر روی توالی کامل همه ژن های شناخته شده میتوکندریایی و رونوشت های انسان، موش و موش صحرائی را در خود جای داده است. به علاوه این بانک اطلاعات مربوط به تعامل هدف - miRNA پیش بینی شده بر روی ژن های وابسته به ۴۴۹ مسیر بیولوژیکی انسانی و ۲۳۵۶ ناهنجاری OMIM را فراهم می کند. ب) اهداف تعیین اعتبار شده، اطلاعات miRNA های به صورت تجربی تایید شده مرتبط به ژن ها، مسیرها، اعضا، بیماری ها، رده های سلولی،

مثالی از شکل اولیه micro RNA و جفت شدن توالی ژن با micro RNA آورده شده است. در شکل ۲ نمونه هایی از توالی های مکمل ژن VEGF و micro RNA هایی که بیشترین تعداد اتصال را با ژن های مورد نظر این مطالعه داشتند؛ آورده شده است.

در مرحله آخر، با شمارش تعداد اتصال های هر یک از micro RNA های شناسایی شده با ژن های مورد نظر و مقایسه آنها، انتخاب نهایی انجام گردید. بیشترین تعداد جایگاه اتصال به ژن های دخیل در رگرایی تومور mir-512، mir-516a، mir-1302، mir-511، mir-516b و mir-548 تعیین شد.

بحث

با توجه به بررسی های بیوانفورماتیکی این مطالعه با استفاده از بانک اطلاعات miRWalk مشخص شد mir-516a، mir-1302، mir-512، mir-511، mir-516b و mir-548 بیشترین جایگاه های اتصال به ژن های MMPs دخیل در رگرایی و پروتئین های محرک رگرایی که در اثر فعالیت پروتئاز MMPs آزاد شده اند را دارا هستند.

با توجه به پایداری بیشتر microRNA ها نسبت به mRNA ها و حضور آنها در اکثر بافت ها و مایعات بدن، دانشمندان بر آن شده اند تا از این توالی های کوتاه ولی موثر برای درمان بیماری ها و سرطان

role of inflammation. *Histochem Cell Biol.* 2008 Dec; 130(6): 1079-90. doi: 10.1007/s00418-008-0527-3

6. Fam NP, Verma S, Kutryk M, Stewart DJ. Clinician guide to angiogenesis. *Circulation.* 2003 Nov; 108(21): 2613-8. doi: 10.1161/01.CIR.0000102939.04279.75

7. Kermorvant-Duchemin E, Pinel AC, Lavalette S, Lenne D, Raoul W, Calippe B, et al. Neonatal hyperglycemia inhibits angiogenesis and induces inflammation and neuronal degeneration in the retina. *PLoS One.* 2013 Nov; 8(11): e79545. doi: 10.1371/journal.pone.0079545

8. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature.* 1993 Apr; 362(6423): 841-4. doi: 10.1038/362841a0

9. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature.* 1993 Apr; 362(6423): 841-4. doi: 10.1038/362841a0

10. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis-a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol.* 2006 May; 44(5): 265-74. doi: 10.1016/j.vph.2006.01.005

11. Pasquet M, Golzio M, Mery E, Rafii A, Benabbou N, Mirshahi P, et al. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer.* 2010 May; 126(9): 2090-101. doi: 10.1002/ijc.24886

12. Fang S, Wei J, Pentinmikko N, Leinonen H, Salven P. Generation of functional blood vessels from a single c-kit+ adult vascular endothelial stem cell. *PLoS Biol.* 2012; 10(10): e1001407. doi: 10.1371/journal.pbio.1001407

13. Tayebe R, Baharara J. [A review on angiogenesis in tumor] *Journal of Cell & Tissue.* Spring 2014; 5(1): 89-100. [Article in Persian]

14. Kanellopoulou C, Monticelli S. A role for microRNAs in the development of the immune system and in the pathogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol.* 2008 Apr; 18(2): 79-88. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.01.002

15. Kim M, Kasinski AL, Slack FJ. MicroRNA therapeutics in preclinical cancer models. *Lancet Oncol.* 2011 Apr; 12(4): 319-21. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70067-5

16. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature.* 1993 Apr; 362(6423): 841-4. doi: 10.1038/362841a0

17. Iyer RP, Patterson NL, Fields GB, Lindsey ML. The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Oct; 303(8): H919-30. doi: 10.1152/ajpheart.00577.2012

18. Egeblad M1, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002 Mar; 2(3): 161-74. doi: 10.1038/nrc745

19. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005 Apr-Jun; 9(2): 267-85.

20. John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res.* 2001; 7(1): 14-23.

21. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov; 14(21): 6735-41. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4843.

22. Gabellini C, Trisciuoglio D, Desideri M, Candiloro A, Ragazzoni Y, Orlandi A, et al. Functional activity of CXCL8 receptors, CXCR1 and CXCR2, on human malignant melanoma progression. *Eur J Cancer.* 2009 Sep; 45(14): 2618-27. doi: 10.1016/j.ejca.2009.07.007

23. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform.* 2011 Oct; 44(5): 839-47. doi: 10.1016/j.jbi.2011.05.002

24. Dweep H, Sticht C, Gretz N. In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. *Current Genomics.* 2013; 14(2): 127-36. doi: 10.2174/1389202911314020005

25. Caldas C, Brenton JD. Sizing up miRNAs as cancer genes. *Nat Med.* 2005 Jul; 11(7): 712-4.

26. Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology.* 2006 Jun; 130(7): 2113-29.

Original Paper

Bioinformatics analysis to predict potential Micro-RNAs inhibiting processes of angiogenesis in cancer

Toroghi F (M.Sc)^{*1}, Toroghi Y (M.Sc)²

¹M.Sc in Cell and Molecular Biology, Department of Drug Affairs- Bostanabad, Tabriz University of Medical Sciences, Bostanabad, Iran. ²M.Sc in Parasitology, Tabriz University of Medical Sciences, Laboratory of Hashtrood, Hashtroud, Iran.

Abstract

Background and Objective: Tumor size results in hypoxic and acidic environment leading to the production of several types of growth factors required for the formation of blood vessels. Afterwards, metastasis of cancerous cells occurs via blood vessels. Therefore angiogenesis inhibition can be a new way of cancer treatment. This study was done to determine the bioinformatics analysis to predict potential Micro-RNAs inhibiting processes of angiogenesis in cancer.

Methods: In this descriptive study, micro-RNAs that are able to connect to MMP genes involved in tumor angiogenesis (MMP1-2-3-8-9-10-11-13) were detected using miRwalk database. Effective Micro-RNAs selection was based on the number of binding sites in 3'UTR genes. MicroRNA data base was used to find sample base pairing sequences.

Results: mir-1302, mir-516a, mir-512, mir-511, mir-516b and mir-548 were determined with the most number of binding sites in genes involved in angiogenesis.

Conclusion: MicroRNAs are worthy options for cell culture and laboratory examination in order to find new ways to prevent the development of cancer by angiogenesis inhibition.

Keywords: Bioinformatics, Angiogenesis, MMPs, MicroRNA

* **Corresponding Author:** Toroghi F (M.Sc), E-mail: fatoroghi@gmail.com

Received 22 Nov 2015

Revised 15 Mar 2016

Accepted 16 Apr 2016